

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Analisis klinik merupakan tindakan yang sangat diperlukan untuk menegakkan diagnosis suatu penyakit. Analisis ini tidak hanya melihat status nutrisi seseorang, tetapi juga sebagai petunjuk awal yang penting dalam mendiagnosis adanya penyakit hati dan penyakit ginjal (Heyden dan Heyningen, 2001). Pada analisis klinik dapat terjadi interferensi yang sangat berdampak pada penatalaksanaan terapi berikutnya. Interferensi berupa hasil pemeriksaan klinik yang menyimpang dari nilai yang sebenarnya. Terjadinya interferensi disebabkan adanya entitas kimia lain dalam suatu sampel. Zat penginterferensi atau interferen dapat berupa material endogen maupun material eksogen seperti obat dan metabolik (Sutedjo, 2008). Oleh sebab itu, kemanfaatan hasil analisis sangat ditentukan oleh akurasi, presisi dan selektivitas metode analisis yang digunakan.

Penetapan kadar protein total sering dilakukan dalam analisis klinik. Metode penetapan kadar protein yang digunakan dalam berbagai bidang analisis dan penelitian adalah metode Lowry (Kresge, Simoni et al, 2005). Metode Lowry memiliki sensitivitas lebih tinggi dibandingkan metode pendahulunya yaitu metode Biuret (Olson and Markwell, 2007). Namun metode ini mempunyai kelemahan, yaitu rentan terhadap terjadinya interferensi oleh senyawa lain yang bersifat mereduksi (Folin and Ciocalteu, 1972; Lowry, Rosebrough et al, 1951).

Senyawa yang mampu menimbulkan interferensi terhadap hasil penetapan kadar protein dengan metode Lowry adalah senyawa yang memiliki gugus fenol dan vitamin C. Vitamin C merupakan senyawa pereduksi kuat (Dewoto, 2007). Fenol dan vitamin C mampu mereduksi kompleks asam fosfomolibdat-fosfotungstat yang berasal dari pereaksi Folik Ciocalteu (Folin Ciocalteu, 1972; Lowry, Rosebrough et al, 1951) dan juga mampu mereduksi kuprum secara langsung (Winters and Minhin, 2005).

Buah pisang raja sering dikonsumsi masyarakat secara langsung maupun dalam bentuk olahan buah. Buah pisang raja dapat diolah menjadi jus atau sari buah serta mengandung karbohidrat, protein, kalsium dan vitamin. Buah pisang juga diketahui memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, tanin, fenol dan saponin (Adeolu and Enesi, 2013). Buah pisang raja dapat meningkatkan kebugaran tubuh, mengatasi sistem pencernaan, memperkuat tulang dan mencegah terjadinya serangan stroke (Budiana N.S, 2013). Senyawa-senyawa yang bersifat mereduksi terdapat dalam buah pisang raja sehingga dapat menginterferensi hasil penetapan kadar protein dengan metode Lowry. Interferensi ini disebabkan pada saat pemeriksaan kadar protein, pasien mengkonsumsi jus atau sari buah pisang raja.

Sejauh ini belum pernah dilakukan penelitian tentang terjadinya interferensi oleh buah pisang raja terhadap hasil penetapan kadar protein dengan metode Lowry. Oleh karena itu, peneliti perlu melakukan penelitian ini yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh penetapan kadar protein buah pisang raja dengan metode Lowry.

B. PERUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang permasalahan yang telah diuraikan, maka masalah penelitian dirumuskan sebagai berikut :

1. Apakah sari buah pisang raja mengandung senyawa – senyawa pereduksi ?
2. Apakah terjadi interferensi oleh senyawa - senyawa yang bersifat mereduksi dalam sari buah pisang raja terhadap penetapan kadar protein dengan metode Lowry?
3. Bagaimana pola interferensi yang terjadi sebagai akibat penambahan sari buah pisang raja pada penetapan kadar protein dengan metode Lowry?

C. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Menguji secara kualitatif senyawa - senyawa pereduksi dalam sari buah pisang raja
2. Mengkaji pengaruh senyawa - senyawa yang bersifat mereduksi dalam sari buah pisang raja terhadap penetapan kadar protein dengan metode Lowry
3. Mengkaji pola interferensi oleh sari buah pisang raja pada penetapan kadar protein dengan metode Lowry

D. MANFAAT PENELITIAN

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memperoleh hasil analisis klinik yang akurat.
2. Memberikan informasi kepada pasien mengenai pengaruh sari buah pisang raja saat pemeriksaan kadar protein.

E. TINJAUAN PUSTAKA

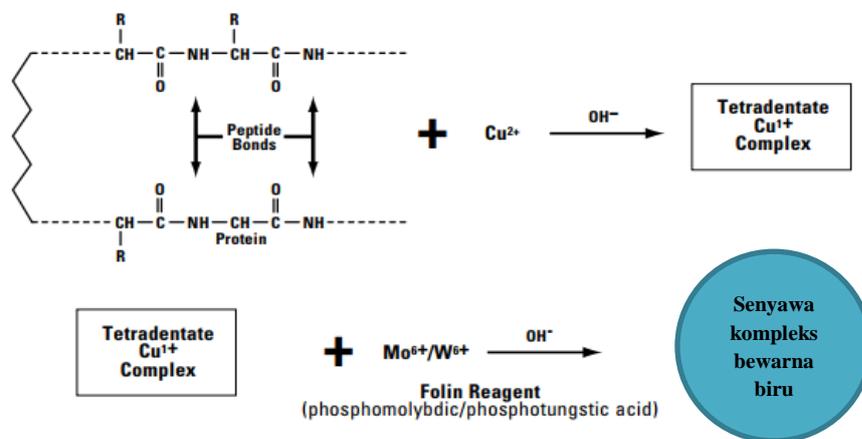
1. Protein

Protein merupakan suatu zat makanan yang sangat penting bagi tubuh, karena zat ini disamping berfungsi sebagai zat pembangun dan pengatur. Protein terdiri dari sumber – sumber asam amino yang mengandung unsur C, H, O dan N yang tidak dimiliki oleh lemak atau karbohidrat. Molekul protein mengandung pula fosfor, belerang dan ada jenis protein yang mengandung unsur logam seperti besi dan tembaga (Budianto, 2009).

Protein termasuk makromolekul polipeptida yang tersusun dari sejumlah L-asam amino yang dihubungkan oleh ikatan peptida. Protein terdiri dari bermacam-macam golongan, makro molekul yang heterogen, walaupun semuanya merupakan turunan dari polipeptida dengan BM yang tinggi. Protein memiliki struktur primer, sekunder, tersier dan kuartener. Protein ditinjau dari strukturnya dibagi dalam dua golongan besar, yaitu golongan protein sederhana dan protein gabungan. Protein sederhana adalah protein yang hanya terdiri dari molekul-molekul asam amino, sedangkan protein gabungan adalah protein yang terdiri dari protein dan gugus bukan protein (Poedjiadi, 2007). Metode yang biasa digunakan dalam rangka penentuan konsentrasi preotein, yaitu metode Biuret, Lowry, dan lain sebagainya. Penentuan konsentrasi protein tersebut merupakan proses yang rutin digunakan dalam kerja Biokimia.

2. Penetapan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Metode Lowry pertama kali diperkenalkan pada tahun 1951 (Lowry, Rosebrough et al, 1951). Metode ini digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dengan reagen pendeteksi gugus-gugus fenolik seperti reagen folin dan ciocalteu. Prinsip mekanisme metode Lowry adalah reduksi Cu^{2+} (reagen Lowry B) menjadi Cu^+ oleh tyrosine, tryptophan, dan sistein yang terdapat dalam protein. Ion Cu^+ bersama dengan fosfotungstat dan fosfomolibdat (reagen Lowry E atau Folin-Ciocalteu) membentuk warna biru, sehingga dapat menyerap cahaya. Kekuatan warna biru terutama bergantung pada kandungan residu tryptophan dan tyrosine-nya. Adapun mekanisme reaksi dapat dilihat pada gambar 1.

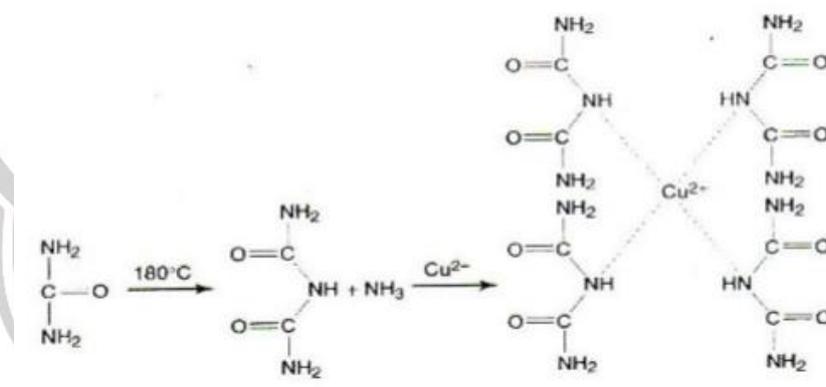


Gambar 1. Mekanisme reaksi metode Lowry (Pierce, 2005)

Metode Lowry memiliki kelebihan yang cukup baik dibandingkan dengan metode Biuret. Metode Lowry lebih sensitif (100 kali) daripada metode Biuret sehingga memerlukan sampel protein yang lebih sedikit. Batas deteksinya berkisar pada konsentrasi 0,01 mg/ml. Namun metode Lowry

lebih banyak interferensinya akibat kesensitifannya (Lowry, Rosebrough et al, 1951). Metode Lowry hanya dapat mengukur molekul peptida pendek dan tidak dapat mengukur molekul peptida panjang.

Metode Lowry merupakan pengembangan metode Biuret. Dalam metode ini terlibat 2 reaksi. Pada reaksi tahap pertama, peptida yang mengandung 3 atau lebih residu asam amino membentuk kompleks tetradentat dengan kupro (Krohn, 2001). Reaksi pertama ini dikenal dengan reaksi Biuret. Reaksi ini terjadi karena senyawa kompleks yang dihasilkan sama seperti kompleks dari senyawa organik Biuret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) yang direaksikan dengan kupri. Biuret merupakan produk yang dihasilkan dari pemanasan urea. Adapun reaksi yang terjadi pada reaksi biuret dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Reaksi Biuret

Pada reaksi kedua dilakukan amplikasi kompleks tetradentat dengan penambahan pereaksi Folin-Ciocalteu. Pada prinsipnya mekanisme amplikasi warna terjadi karena reduksi pereaksi Folin-Ciocalteu menjadi heteropolymolybdenum blue. Reduksi ini menurut Krohn (2001) terjadi karena proses transfer elektron kompleks tetradentat asam fosfomolibdat-

fosfotungstat. Metode Lowry mengkombinasikan pereaksi Biuret dengan pereaksi lain (Folin-Ciocalteu phenol) yang bereaksi dengan residu tyrosine dan tryptophan dalam protein. Reaksi ini menghasilkan warna kebiruan yang dapat dibaca diantara panjang gelombang 500-750 nm, tergantung sensitivitas yang dibutuhkan (Lowry, Rosebrough et al, 1951).

Beberapa zat yang bisa mengganggu penetapan kadar protein dengan metode Lowry ini, diantaranya buffer, asam nukleat, gula atau karbohidrat, deterjen, gliserol, Tricine, EDTA, Tris, senyawa-senyawa kalium, sulfhidril, disulfida, fenolat, asam urat, guanin, xanthine, magnesium, dan kalsium. Interferensi agen-agen ini dapat diminimumkan dengan menghilangkan interferens tersebut. Sangat dianjurkan untuk menggunakan blanko untuk mengkoreksi absorbansi (Lowry, Rosebrough et al, 1951).

3. Interferensi pada Analisa Klinik

Interferensi merupakan efek dari suatu zat yang ada dalam sampel yang mengubah nilai sesungguhnya dari hasil suatu analisis. Interferensi berdasarkan sumbernya dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu interferensi endogen dan interferensi eksogen. Interferensi endogen terjadi karena adanya materi yang secara alami terdapat dalam spesimen, seperti lipid, hemoglobin dan bilirubin. Sedangkan interferensi eksogen terjadi karena adanya materi yang secara alami tidak terdapat pada spesimen, seperti obat, racun, produk herbal, dan cairan intravena (Sibaba, Bhaskar et al, 1998; Dimeksy, 2008).

Interferensi tidak hanya terjadi karena adanya interaksi interferen dan reagen, tetapi juga karena adanya interaksi interferen dan analit. Tiga tipe interferensi yang dapat terjadi yaitu : *analyte dependen*, jika derajat interferensi tergantung kadar; *analyte independen* yaitu saat interferensi nilainya konstan seberapapun kadar analit; serta pola interferensi kombinasi keduanya, yaitu saat efek yang dihasilkan interferen tergantung pada interaksi analit dan interferensi. Pola interferensi menggunakan analisis regresi berganda ditetapkan dengan model persamaan berikut :

$$F(A,R) = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2R + \beta_3A.R$$

Model persamaan tersebut menggambarkan interferensi yang terjadi sebagai berikut :

F : variabel-variabel bebas

A : kadar analit

R : kadar sari buah pisang raja

A.R : kadar interaksi analit-sari buah pisang raja

F (A.R) : variabel bebas

Dinyatakan sebagian besar perubahan absorbansi yang terbaca atau besarnya perubahan kadar protein. Signifikansi koefisien regresi menunjukkan bahwa pola interferensi yang terbentuk (Kroll, Ruddel et all, 1987).

4. Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik merupakan kelompok metabolit sekunder terbesar pada tanaman. Senyawa ini termasuk senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang menempel di cincin aromatik. Dengan kata lain, senyawa fenolik adalah senyawa yang sekurang-kurangnya memiliki satu gugus fenol. Banyaknya variasi gugus yang mungkin tersubsitusi pada kerangka utama fenol menyebabkan kelompok fenolik memiliki banyak sekali anggota (Marinova, Ribarova et al, 2005). Klasifikasi senyawa fenolik berdasarkan jumlah atom karbon adalah sebagai berikut :

Tabel I. Klasifikasi senyawa fenolik berdasarkan jumlah atom karbon (Vermerris dan Nicholson, 2006)

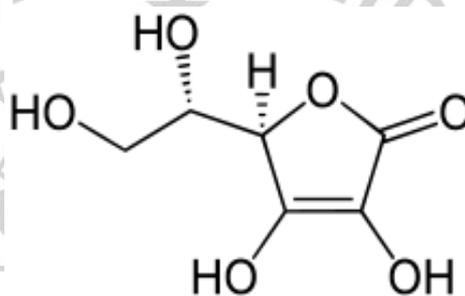
Struktur	Kelas
C_6	Fenolik sederhana
C_6-C_1	Asam fenolat dan senyawa yang berhubungan
C_6-C_2	Asetofenon dan asam fenilasetat
C_6-C_3	Asam sinamat, sinamil aldehyd, sinamil alkohol
C_6-C_3	Koumarin, isokoumarin dan kromon
C_{15}	Kalkon, auron, dihidrokalkon
C_{15}	Flavan
C_{15}	Flavon
C_{15}	Flavanon
C_{15}	Flavononol
C_{15}	Antosianidin
C_{15}	Antosianin
C_{30}	Biflavonil
$C_6-C_1-C_6, C_6-C_2-C_6$	Benzofenon, xanton, stilben
C_6, C_{10}, C_{14}	Kuinon
C_{18}	Betasianin
Lignan, neolignan	Dimer atau oligomer
Lignin	Polimer
Tanin	Oligomer atau polimer
Phlobaphene	Polimer

Aktivitas biologis senyawa fenolik sangat luas meliputi antibakteri, antiinflamasi, antitromboliti, antivirus, hepatoprotektif, antikanker dan anti alergi. Aktivitas – aktivitas tersebut sering kali dikaitkan dengan mekanisme kerjanya sebagai antioksidan. Senyawa alami antioksidan tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid turunan asam sinamat, kumarin, dan tokoferol. Senyawa ini diklasifikasikan dalam dua bagian yaitu fenol sederhana dan polifenol. Senyawa fenolik bersifat esensial untuk pertumbuhan dan reproduksi tanaman, serta diproduksi sebagai respon pertahanan terhadap patogen dan kondisi stres pada tanaman. Senyawa fenolik merupakan pemberi warna, rasa dan aroma yang spesifik pada bagian tanaman tertentu seperti antosianin sebagai pigmen warna merah dan ungu, eugenol sebagai pemberi aroma dan flavanon yang menyebabkan rasa pahit. Karakteristik kelompok senyawa ini dikenal tidak stabil dan mudah teroksidasi terutama dalam kondisi basa, larut dalam pelarut organik polar, sedangkan bentuk glikosidanya larut dalam air (Yordi, Perez et al, 2012).

5. Vitamin C

Vitamin C termasuk vitamin yang larut air, berbentuk serbuk atau hablur, tidak berwarna atau putih atau kuning pucat, tidak berbau atau hampir tidak berbau dan mempunyai rasa asam. Dalam keadaan kering vitamin C cukup stabil, tetapi dalam keadaan larut vitamin C mudah rusak karena bersentuhan dengan udara terutama bila terkena panas. Vitamin C tidak stabil dalam larutan alkali, tetapi cukup stabil dalam larutan asam (Almatsier, 2004).

Struktur vitamin C mengandung gugus enediol dan berfungsi dalam sistem perpindahan hydrogen yang menunjukkan peranan penting dari vitamin C. Vitamin C dapat terbentuk sebagai asam L-askorbat dan asam L-dehidroaskorbat, keduanya mempunyai keaktifan sebagai vitamin C. Asam askorbat sangat mudah teroksidasi secara reversible menjadi asam L-dehidroaskorbat. Asam L-dehidroaskorbat secara kimia sangat labil dan mengalami perubahan lebih lanjut menjadi asam L-diketogulonat yang tidak memiliki keaktifan vitamin C lagi (Winarno, 1984).



Gambar 3. Struktur Kimia Vitamin C (Anonim, 1995)

Vitamin C adalah zat pereduksi kuat yang dapat bertindak sebagai antioksidan (Dewoto, 2007). Sebagai reduktor, vitamin C mereduksi cupri (Cu^{2+}) menjadi cuprus (Cu^+) dan ion ferri (Fe^{3+}) menjadi ion ferrous (Fe^{2+}) yang akan berpengaruh terhadap penyerapannya di usus halus dan memberikan efek yang menguntungkan (Jourkesh, Sadri et al, 2011). Vitamin C bertindak sebagai agen pereduksi dalam larutan cair seperti darah dan dalam sel. Fungsi vitamin C adalah sebagai kekebalan dan vitamin C dapat mempercepat penyerapan besi di dalam tubuh, sehingga kadar hemoglobin meningkat (Linder, 1992).

6. Buah Pisang Raja (*Musa paradisiaca* L.)

a. Klasifikasi

Kedudukan buah pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) dalam sistematik tanaman (Steenis, 2003) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Divisi : Spermatophyta
Subdivisi : Magnoliophyta
Class : Monocotyledonae
Ordo : Musales
Famili : Musaceae
Genus : *Musa*
Spesies : *Musa paradisiaca* L.



Gambar 4. Buah pisang raja (Sunarjono, 1998)

b. Morfologi

Tanaman pisang raja merupakan jenis tanaman yang dapat tumbuh sekitar 2,1 - 2,9 meter dan berakar serabut yang tumbuh menuju bawah sampai kedalaman 75 - 150 cm. Batang pisang raja semu tegak bewarna hijau hingga merah dan memiliki noda coklat atau hitam. Batang semu ini terbentuk dari pelepah daun panjang yang saling menutupi sehingga dapat berdiri tegak seperti batang tanaman, oleh karena itu batang semu sering dianggap sebagai batang tanaman yang sesungguhnya. Tinggi batang semu ini berkisar antara 3,5-7,5 meter. Helai daunnya berbentuk lanset memanjang yang letaknya tersebar dengan bagian bawah daun tampak berlilin. Daun ini diperkuat oleh tangkai daun yang panjangnya antara 30 - 40 cm (Daniells, 2001).

Tanaman pisang raja berbunga pada umur 14 bulan dan masak sekitar 3,5 bulan setelah berbunga. Bunga menyerupai jantung, berkelamin satu yaitu berumah satu dalam satu tandan dan berwarna merah tua. Bunga pisang yang telah keluar akan membentuk satu kesatuan bakal buah yang disebut sisir. Sisir pertama yang terbentuk akan terus memanjang membentuk sisir kedua, ketiga dan seterusnya. Buah pisang tersusun dalam tandan, dengan tiap tandan terdiri atas beberapa sisir. Tandan mencapai panjang 40-60 cm, merunduk dan berbulu halus. Buahnya melengkung ke atas, dalam satu kesatuan terdapat 13 - 16 buah dengan panjang sekitar 16 - 20 cm. Daging buah bewarna putih kekuningan, kuning muda atau kemerah-merahan, tidak berbiji, rasa agak manis sampai

manis, agak keras dan kurang beraroma. Daging buah tebal dan lunak, dengan kulit buah yang masih muda bewarna hijau dan ketika tua berubah menjadi kuning (Rukmana, 1999).

c. Kandungan Buah Pisang Raja

Berikut adalah daftar nilai gizi daging buah pisang raja tiap 100 gram daging buah (buah matang) :

Tabel II. Nilai gizi daging buah pisang raja (Pusat Kajian Buah-Buahan Tropika, 2005)

No.	Komponen	Jumlah
1.	Energi (kkal)	118,92
2.	Total gula (g)	25,94
3.	Air (g)	70,20
4.	Protein (g)	1,48
5.	Lemak (g)	0,36
6.	Karbohidrat (g)	27,44
7.	Asam folat (μ g)	9,39
8.	Vitamin B1 (mg)	0,17
9.	Vitamin B2 (mg)	0,14
10.	Vitamin B6 (mg)	0,80
11.	β -karoten (mg)	0,34
12.	Vitamin C (mg)	4,49
13.	Kalsium (mg)	19,76
14.	Besi (mg)	0,49
15.	Kalium (mg)	310,00
16.	Natrium (mg)	1,28
17.	Fosfor (mg)	0,32

Buah pisang raja selain mempunyai kandungan gizi yang cukup, buah ini juga memiliki keunggulan dalam hal rasa yang sangat manis, bertekstur lunak dan tidak berbiji. Buah pisang raja mengandung β -karoten yang tinggi daripada pisang jenis lainnya (Pusat Kajian Buah-Buahan Tropika, 2005). Buah pisang raja juga diketahui memiliki kandungan alkaloid,

flavonoid, tanin, fenol dan saponin (Adeolu and Enesi, 2013). Senyawa fenolik khususnya kelompok flavonoid diketahui memiliki sifat sebagai antioksidan. Sifat redoks yang dimiliki senyawa antioksidan memungkinkannya berperan sebagai agen pereduksi, donor hidrogen, penangkap singlet oksigen dan pengkelat besi (Kaur and Kapoor, 2002). Adanya senyawa flavonoid, tanin, fenol, saponin dan vitamin C sebagai agen pereduksi pada pisang raja dapat mempengaruhi hasil penetapan kadar protein menggunakan metode Lowry.

F. LANDASAN TEORI

Buah pisang raja mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, fenol dan saponin (Adeolu dan Enesi, 2013). Adanya senyawa-senyawa dalam pisang raja tersebut memungkinkan terjadinya interferensi terhadap hasil penetapan kadar protein dengan metode Lowry. Metode Lowry rentan terhadap terjadinya interferensi oleh senyawa yang bersifat mereduksi (Folin and Ciocalteu, 1927; Lowry, Rosebrough et al, 1951). Senyawa-senyawa yang bersifat sebagai pereduksi tersebut diantara senyawa fenolik dan vitamin C. Flavonoid dan tanin termasuk dalam golongan senyawa fenolik, dimana senyawa yang mengandung gugus fenol mampu mereduksi kompleks asam fosfomolibdat-fosfotungstat (Folin and Ciocalteu, 1927; Lowry, Rosebrough et al, 1951) dan mereduksi kuprum secara langsung (Winters and Michin, 2005). Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa parasetamol (Riandono, 2011), doksisisiklin (Hayva, 2015), estradiol (Kartipa, 2015), sefadroksil (Elfi, 2016), levodopa (Betta, 2016) adalah senyawa yang memiliki gugus fenol yang bersifat sebagai pereduksi, sehingga menyebabkan

terjadinya interferensi pada penetapan kadar protein dengan metode Lowry. Penelitian Beta (2016) menyebutkan bahwa interferensi akibat gugus fenol yang mereduksi menyebabkan pola interaksi *analyte independen* sebagai interferensi disebabkan tablet levodopa tidak tergantung dari kadar protein dan terjadi pada berapapun besarnya kadar protein dalam sampel.

Vitamin C juga memiliki sifat sebagai reduktor yang mampu mereduksi kompleks asam fosfomolibdat-fosfotungstat dan mereduksi kuprum secara langsung (Winters and Michin, 2005). Hasil penelitian Budiarti (2017) menyatakan bahwa vitamin C dapat menyebabkan interferensi sehingga mempengaruhi hasil pemeriksaan kadar protein dengan metode Lowry dengan pola interferensi berupa *analyte independen*. Dengan demikian sari buah pisang raja memiliki efek yang sama.

G. HIPOTESIS

Berdasarkan landasan teori tersebut, hipotesis yang dapat diajukan pada penelitian ini adalah

1. Sari buah pisang raja mengandung senyawa pereduksi seperti flavonoid, tanin dan vitamin C.
2. Senyawa - senyawa yang bersifat mereduksi dalam sari buah pisang raja menimbulkan interferensi pada penetapan kadar protein dengan metode Lowry.
3. Pola interferensi yang terjadi berupa *analyte independen*.